

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001270

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04006142.6
Filing date: 15 March 2004 (15.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04006142.6

EP / 05 / 1270

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

1991. 11. 13



Anmeldung Nr:
Application no.: 04006142.6
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 15.03.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

UREA CASALE S.A.
Via Giullio Pocobelli, 6
6900 Lugano-Besso
SUISSE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Process for the production of granules or pellets containing filamentary fungi

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C12N/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PL PT RO SE SI SK TR LI

- 1 -

Titolo: Procedimento per la produzione di granuli o pellets contenenti funghi filamentosi

DESCRIZIONE

Campo di applicazione

- 5 La presente invenzione riguarda il settore tecnico degli agenti fitosanitari.

In particolare, l'invenzione si riferisce ad un procedimento per la produzione su scala industriale di granuli o pellets contenenti funghi filamentosi, più in particolare funghi nematofagi.

10 Arte nota

L'utilizzo di microrganismi e in particolare di funghi come agenti fitosanitari costituisce una pratica sempre più frequente.

Prodotti a base di funghi sono già commercializzati per la lotta contro insetti, funghi fitopatogeni e altri parassiti delle colture agricole.

- 15 Ad esempio, nel brevetto US 5 811 092 sono descritti agenti nematofagi per combattere nematodi dei generi *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Ditylenchus*, costituiti da particolari ceppi di *Arthrobotrys conoides* Dreschsler, un fungo filamentoso.

- 20 I succitati nematodi sono responsabili di gravi malattie a carico di vegetali e funghi e causano perdite economiche ingentissime, poiché portano alla compromissione di una percentuale di raccolto dell'ordine del 50-70%.

- 25 L'utilizzo di funghi nematofagi, in alternativa agli usuali antiparassitari chimici (ad es. bromuro di metile, tricloronitrometano, dicloropropene ecc.) da applicare al terreno prima di iniziare la coltivazione o ai carbammati applicati alle colture, consente di evitare gravi inconvenienti, quali la sterilizzazione del terreno, la distruzione dell'equilibrio ecologico e la potenziale tossicità verso l'uomo e gli

- 2 -

animali.

I funghi nematofagi sono pertanto particolarmente adatti ad essere utilizzati in coltivazioni di agricoltura biologica ma vi è attualmente una notevole difficoltà a produrli industrialmente con rese elevate e in forme
5 adatte a garantire una adeguata durata di conservazione prima dell'utilizzazione.

Infatti, nella tecnica nota, i funghi nematofagi vengono prodotti in un brodo di coltura adatto. Quindi, i funghi nematofagi con il relativo brodo di coltura vengono direttamente dispersi sul terreno da trattare oppure i
10 suddetti funghi vengono conservati nel brodo di coltura prima dell'uso. Tuttavia, in queste condizioni di conservazione, i funghi nematofagi continuano a riprodursi piuttosto velocemente e, dopo un breve periodo, (1-2 settimane) muoiono in quanto terminano le fonti di nutrimento.

Il problema alla base della presente invenzione è stato quello di mettere
15 a disposizione un procedimento per la produzione su scala industriale di funghi filamentosi, in particolare funghi nematofagi, con rese elevate, costi ridotti e in una forma adeguata a garantirne stabilità e vitalità per lunghi periodi di conservazione prima dell'impiego sui terreni da trattare.

20 Sommario dell'invenzione

L'idea di soluzione di un tale problema tecnico è stata quella di inglobare i funghi filamentosi in adatte formulazioni solide che ne garantissero la stabilità e la vitalità per lunghi periodi. A questo
25 riguardo, formulazioni granulari o pellets contenenti funghi filamentosi sono risultate essere adatte agli scopi della presente invenzione.

Alla luce della suddetta idea, il problema tecnico alla base della presente invenzione viene risolto da un procedimento per la produzione di granuli o pellets contenenti funghi filamentosi comprendente le fasi di :

- 30 - selezionare e crescere funghi filamentosi in un adatto mezzo di coltura per un tempo prestabilito,

- 3 -

- miscelare detto mezzo di coltura, dopo detto tempo prestabilito, con un agente promotore di gelificazione ed almeno un eccipiente, così da ottenere una miscela,
- sottoporre detta miscela a gelificazione mediante contatto, goccia a goccia, con una soluzione contenente un sale di calcio ottenendo così pellets o granuli gelificati contenenti detti funghi filamentosi,
- essiccare detti pellets o granuli gelificati ad un contenuto di umidità di 13-18%.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

10 La presente invenzione sarà ulteriormente descritta facendo riferimento ad alcuni esempi di realizzazione forniti a titolo illustrativo e non limitativo.

15 Prima di procedere con l'illustrazione degli esempi, si ritiene utile fornire alcune precisazioni circa i prodotti utilizzati per attuare le varie fasi del procedimento di produzione secondo l'invenzione.

I funghi filamentosi impiegati nel procedimento secondo l'invenzione appartengono alla famiglia dei Moniliales, preferibilmente sono funghi filamentosi di *Arthrobotrys conoides* Dreschler.

20 Il mezzo di coltura per funghi filamentosi comprende almeno una fonte di carbonio scelta dal gruppo costituito da melassa, estratto di malto e saccarosio e almeno una fonte di azoto organico scelta tra estratto di lievito e "corn steep liquor".

25 Preferibilmente la suddetta almeno una fonte di carbonio costituisce da 70 a 85% in peso del peso secco del mezzo di coltura e la suddetta almeno una fonte di azoto organico costituisce da 15 a 30% in peso del peso secco del mezzo di coltura.

Il mezzo di coltura può inoltre comprendere una fonte di azoto minerale, costituita da nitrati o sali d'ammonio. La suddetta fonte di azoto minerale viene generalmente aggiunta gradualmente al mezzo di coltura

- 4 -

durante la crescita dei funghi in una quantità non superiore al 10% in peso del peso secco del mezzo di coltura e generalmente compresa fra 5 e 8% in peso.

5 Una composizione di mezzo di coltura preferita è costituita da 75-85% estratto di malto e 15-25% estratto di lievito, le percentuali essendo in peso sul peso secco del mezzo di coltura.

10 Un altro mezzo di coltura preferito comprende 60-65% di melassa, 10-15% di saccarosio, 10-15% di corn steep liquor e 10-15% di estratto di lievito. Vantaggiosamente tale mezzo di coltura contiene, in aggiunta, da 5 a 8% di una fonte di azoto minerale, in particolare idrogenofosfato di diammonio.

Un ulteriore mezzo di coltura preferito contiene due sorgenti di carbonio, ovvero estratto di malto, in quantità del 25-30%, e melassa, in quantità del 40-45%, nonché corn steep liquor, in quantità del 25-30%.

15 L'estratto di malto è ottenuto per germinazione di chicchi di cereali (generalmente orzo). Al momento della germinazione vengono prodotti particolari enzimi (amilasi), che permettono la trasformazione dell'amido in zuccheri. L'estratto di malto contiene circa 60% di maltosio, vitamine e numerosi oligoelementi.

20 La melassa costituisce un sottoprodotto dell'industria zuccheriera e si presenta sotto forma di un liquido viscoso bruno-nero, contenente 10% di acqua, 35% di saccarosio, 20% di altri zuccheri e 15% di ceneri.

25 L'estratto di lievito è ottenuto per autolisi di *Saccharomyces cerevisiae* e si presenta sotto forma di polvere fine di colore giallo pallido, facilmente solubile in acqua. L'estratto di lievito contiene peptidi, amminoacidi liberi, basi puriniche e pirimidiniche, nonché vitamine idrosolubili del gruppo B. L'estratto di lievito ha un contenuto di azoto totale del 10% e un contenuto di azoto α -amminico del 5%.

30 Il corn steep liquor è ottenuto mediante macerazione dei chicchi di mais a 50°C per 24-48 ore in acqua contenente anidride solforosa. Quest'ultimo reagente consente di disorganizzare il reticolo proteico che

- 5 -

circonda i granuli d'amido e offre il vantaggio di impedire lo sviluppo di microrganismi indesiderati durante la macerazione. Il corn steep liquor ha un contenuto di azoto totale del 7% ed un contenuto di azoto α-amminico dell'1,7% e contiene altresì 5% di zuccheri, 4% di potassio, 3% di fosforo e 17% di minerali diversi.

Nel procedimento di produzione secondo l'invenzione, la crescita del fungo filamentoso nei succitati mezzi di coltura viene effettuata preferibilmente per un tempo di 5-10 giorni ad una temperatura costante di 23-30°C.

10 L'agente promotore della gelificazione è preferibilmente costituito da una soluzione contenente alginato di sodio ad una concentrazione di 1-2%, di preferenza 1,3% in peso sul peso della soluzione. Tale soluzione viene preferibilmente aggiunta al mezzo di coltura del fungo filamentoso secondo un rapporto in volume mezzo di coltura/soluzione di alginato da 40:60 a 60:40.

Come è noto, l'alginato di sodio è in grado di promuovere la gelificazione di una miscela liquida alla quale esso viene aggiunto, mediante contatto della miscela con una soluzione contenente sali di calcio.

20 Un aspetto importante è costituito dall'aggiunta di eccipienti al mezzo di coltura. Nella presente invenzione, con il termine "eccipienti" s'intende comprendere sia prodotti in grado di conferire stabilità e/o nutrimento ai funghi dispersi nei granuli affinché i funghi restino vitali durante lo stoccaggio degli stessi e al momento dell'uso, sia prodotti "riempitivi" (fillers) cioè in grado di conferire ai granuli la consistenza ed il volume desiderati.

Preferibilmente, i succitati eccipienti sono scelti dal gruppo comprendente terre di diatomee, farine e zuccheri.

30 Un eccipiente preferito è costituito da Celaton FPM 0,08. Esso è un prodotto commerciale a base di conchiglie di diatomee (alghe unicellulari silicee) e presenta una granulometria di circa 0,08 micron. Questo prodotto è in grado di assorbire una quantità d'acqua definita ed

- 6 -

è pertanto di ausilio al conferimento di un volume desiderato per i granuli finali.

5 Tra le farine utilizzabili quali eccipienti nella presente invenzione è particolarmente preferita la farina di mais. Essa è un prodotto naturale in grado di assorbire una quantità d'acqua pari a molte volte il suo volume e, nel caso specifico, anch'essa è di ausilio al conferimento di un volume desiderato per i granuli finali. In aggiunta, la farina di mais costituisce una fonte di nutrimento importante per i funghi filamentosi dispersi nei granuli durante lo stoccaggio e al momento della
10 dispersione dei granuli nel terreno da trattare.

In particolare, l'impiego di farina di mais quale fonte di nutrimento è particolarmente vantaggioso nel caso del fungo *Arthrobotrys conoides* Dreschsler, poiché in tal caso si riscontra sorprendentemente che detto fungo sviluppa un maggior numero di trappole per i nematodi con un
15 conseguente aumento di efficacia nella lotta agli stessi.

Gli zuccheri consentono vantaggiosamente ai funghi filamentosi di restare vitali durante la conservazione stabilizzando le membrane cellulari. Tra gli zuccheri impiegabili nel procedimento secondo l'invenzione, il saccarosio risulta essere particolarmente preferito.

20 Preferibilmente, nella presente invenzione, gli eccipienti sono aggiunti al mezzo di coltura tramite l'agente promotore di gelificazione. In pratica, utilizzando una soluzione di alginato di sodio quale agente promotore di gelificazione, gli eccipienti vengono preferibilmente aggiunti a detta soluzione di alginato di sodio in percentuali da 6% a 22% in peso sul
25 peso della soluzione. In una modalità particolarmente preferita, gli eccipienti sono aggiunti alla soluzione di alginato di sodio in una percentuale di 15% in peso sul peso della soluzione.

Nel procedimento secondo l'invenzione, la gelificazione della miscela contenente i funghi filamentosi e il relativo mezzo di coltura nonché il
30 promotore di gelificazione e gli eccipienti viene effettuata preferibilmente aggiungendo detta miscela, goccia a goccia, ad una soluzione di un sale di calcio.

- 7 -

Il sale di calcio è preferibilmente scelto tra cloruro di calcio o di gluconato di calcio. La concentrazione del sale di calcio nella soluzione è compresa tra 0,2 M e 0,3 M ed è preferibilmente 0,25 M nel caso del cloruro di calcio. Generalmente, la gelificazione procede più velocemente all'aumentare della concentrazione del sale di calcio.

I granuli o pellets gelificati che si vengono a formare dal contatto delle gocce della suddetta miscela con la soluzione del sale di calcio prescelto vengono lasciati stazionare nella suddetta soluzione per un tempo prestabilito, preferibilmente 2-3 minuti, in modo da completare la gelificazione.

La rimozione dei granuli o pellets gelificati dalla soluzione di sale di calcio viene effettuata in maniera convenzionale, ad esempio per filtrazione.

L'essiccazione dei pellets o granuli gelificati può essere realizzata convenientemente mediante un flusso di aria sterile ad una temperatura di 25-30°C. Generalmente, i pellets o granuli gelificati ottenuti dalla gelificazione delle gocce di miscela aggiunte alla soluzione prescelta di sale di calcio, hanno un contenuto di umidità di 80-90%. Tale contenuto di umidità viene ridotto per mezzo dell'essiccazione ad un valore di 13-18%. In tal modo, i granuli raggiungono la consistenza ed il volume desiderati anche con l'ausilio degli eccipienti aggiunti in precedenza al mezzo di coltura.

Preferibilmente, con il procedimento secondo l'invenzione, vengono ottenuti granuli o pellets di 1-3 mm di diametro per avere una migliore dispersione dei funghi filamentosi sul terreno da trattare.

Il procedimento secondo l'invenzione può essere convenientemente realizzato su scala industriale mediante apparecchiature poco costose e di semplice progettazione. Un'apparecchiatura adatta, descritta brevemente qui di seguito a titolo di esempio non limitativo, comprende un reattore per la crescita dei funghi filamentosi desiderati nel mezzo di coltura adatto, un miscelatore nel quale l'agente promotore di gelificazione e gli eccipienti sono miscelati al mezzo di coltura così da

- 8 -

5 formare una miscela, mezzi adatti per alimentare quantità dosate della miscela a opportuni elementi forati così da formare gocce di miscela di volume prefissato, un recipiente contenente una soluzione acquosa di sali di calcio per raccogliere le succitate gocce e consentirne la gelificazione, e un essiccatore per essiccare i granuli o pellets gelificati recuperati dal recipiente contenente la soluzione acquosa di sali di calcio.

10 I mezzi per alimentare quantità dosate della miscela possono comprendere ad esempio una pompa peristaltica o simili dispositivi mentre gli elementi forati possono essere tubi ciascuno terminanti inferiormente con un foro di diametro prestabilito, ad esempio 1-4 mm.

15 E' importante che la succitata apparecchiatura operi in ambiente sterile al fine di evitare contaminazioni da parte di microrganismi, in particolare di quelli antagonisti dei funghi filamentosi desiderati. Anche i prodotti utilizzati per l'attuazione del procedimento secondo l'invenzione, in particolare i prodotti aggiunti al mezzo di coltura nel miscelatore dovrebbero essere opportunamente sterilizzati prima dell'uso.

20 I granuli o pellets ottenuti secondo il procedimento dell'invenzione sono pronti per l'uso ma vantaggiosamente i funghi filamentosi contenuti in essi restano stabili e vitali per lunghi periodi. I succitati granuli o pellets si prestano quindi ad essere conservati o stoccati per un lungo tempo prima dell'uso al termine del quale i funghi filamentosi mantengono una vitalità del tutto soddisfacente per le applicazioni a cui sono destinati.

25 La durata di conservazione dei granuli o pellets secondo l'invenzione prima dell'uso è vantaggiosamente superiore a 8 settimane ed è generalmente compresa tra 4 e 6 mesi.

30 Gli esempi che seguono di attuazione del procedimento secondo l'invenzione sono stati realizzati con funghi filamentosi della famiglia dei Moniliales, preferibilmente sono funghi filamentosi di *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

- 9 -

ESEMPIO 1

La coltura del fungo filamentoso è stata eseguita in un reattore da 2 lt, contenente 1,2 l di mezzo di coltura.

5 Il reattore è preferibilmente costituito da un contenitore con fondo bombato, provvisto di agitatore a pale, di mezzi di riscaldamento e di raffreddamento, di mezzi per insufflare aria, nonché di sonde per la rilevazione di pH, O₂ e temperatura.

10 Il mezzo era costituito da 20 g/l di estratto di malto e 4 g/l di estratto di lievito ed era stato sterilizzato prima di essere seminato con conidi del fungo in questione.

La coltura è stata protratta per 6 giorni dalla semina ad una temperatura di circa 27°C.

15 Nel corso della coltura sono stati effettuati prelievi di campioni del mezzo di coltura per determinare la massa secca (g/l) e il numero di propagoli (CFU/l). Per determinare la massa secca, 20 ml del mezzo di coltura sono stati filtrati e poi portati a secco in stufa a 100°C per 24 ore. Il numero di propagoli è stato determinato su 1 ml di mezzo di coltura.

20 Al termine dei giorni di coltura si ottengono dunque quasi 8 g/l di funghi con un numero di propagoli di 6×10^9 per litro.

Il mezzo di coltura contenente i funghi viene quindi trasferito in un miscelatore e addizionato di 1800 ml di una soluzione acquosa allo 1,3 % in peso di alginato di sodio, alla quale soluzione era stato aggiunto 6,6 % di Celaton FPM 0,08 (in peso sul peso della soluzione).

25 La miscela risultante viene quindi omogeneizzata nel miscelatore ed aggiunta, goccia a goccia, attraverso un tubo forato (diametro del foro 1,6 mm) in un recipiente contenente una soluzione 0,25M di cloruro di calcio.

Si ottengono così granuli gelificati della suddetta miscela che vengono

- 10 -

lasciati stazionare nella soluzione di cloruro di calcio per 3 minuti.

Trascorso il tempo di stazionamento, i granuli gelificati vengono separati per decantazione ed essiccati su di un nastro trasportatore ad un contenuto di umidità di 17 %. Il diametro medio dei granuli secchi è
5 di 2,2 mm.

Il numero medio di propagoli nei granuli secchi, come determinato subito dopo la loro formazione, è sostanzialmente uguale a quello determinato al termine dei giorni di coltura del fungo filamentoso dimostrando che i suddetti propagoli sono sopravvissuti interamente al
10 processo di granulazione della presente invenzione.

I suddetti granuli secchi sono conservati per 3 mesi a temperatura ambiente. Al termine del periodo di conservazione, il numero medio di propagoli sopravvissuti è pari a 50 % di quello determinato dopo la formazione di granuli.

15 ESEMPIO 2

La prova dell'esempio 2 è stata ripetuta nelle stesse condizioni sperimentali dell'esempio 1 con l'eccezione che il mezzo di coltura è addizionato di 1800 ml di una soluzione acquosa allo 1,3 % in peso di alginato di sodio, alla quale soluzione era stato aggiunto 6,6 % di
20 Celaton FPM 0,08 e 3,3 % di farina di mais (in peso sul peso della soluzione).

Il diametro medio dei granuli secchi è di 2,5 mm e la loro umidità di 17 %.

Il numero medio di propagoli nei granuli secchi, come determinato subito dopo la loro formazione, è sostanzialmente uguale a quello determinato al termine dei giorni di coltura del fungo filamentoso dimostrando che i suddetti propagoli sono sopravvissuti interamente al
25 processo di granulazione della presente invenzione.

I suddetti granuli secchi sono conservati per 3 mesi a temperatura
30 ambiente. Al termine del periodo di conservazione, il numero medio di

- 11 -

propagoli sopravvissuti è pari a 90 % di quello determinato dopo la formazione di granuli, ciò che consente ai granuli secchi di poter essere efficacemente impiegati su di un terreno come agenti fitosanitari.

ESEMPIO 3

5 La prova dell'esempio 3 è stata ripetuta nelle stesse condizioni sperimentali dell'esempio 1 con l'eccezione che il mezzo di coltura è addizionato di 1800 ml di una soluzione acquosa allo 1,3 % in peso di alginato di sodio, alla quale soluzione era stato aggiunto 6,6 % di celaton FPM 0,08, 3,3 % di farina di mais e 5 % di saccarosio (in peso
10 sul peso della soluzione).

Il diametro medio dei granuli secchi è di 2,9 mm e la loro umidità di 17 %.

Il numero medio di propagoli nei granuli secchi, come determinato subito dopo la loro formazione, è sostanzialmente uguale a quello
15 determinato al termine dei giorni di coltura del fungo filamentoso dimostrando che i suddetti propagoli sono sopravvissuti interamente al processo di granulazione della presente invenzione.

I suddetti granuli secchi sono conservati per 3 mesi a temperatura ambiente. Al termine del periodo di conservazione, il numero medio di
20 propagoli sopravvissuti è pari a 100 % di quello determinato dopo la formazione di granuli, ciò che consente ai granuli secchi di poter essere efficacemente impiegati su di un terreno come agenti fitosanitari.

Inoltre, nell'uso dei suddetti granuli, si riscontra una maggior efficacia del fungo nel combattere i nematodi in virtù del fatto che il fungo
25 sviluppa un maggior numero di trappole per essi.

- 12 -

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di granuli o pellets contenenti funghi filamentosi comprendente le fasi di :

- 5 - selezionare e crescere funghi filamentosi in un adatto mezzo di coltura per un tempo prestabilito,
- miscelare detto mezzo di coltura, dopo detto tempo prestabilito, con un agente promotore di gelificazione ed almeno un eccipiente, così da ottenere una miscela,
- 10 - sottoporre detta miscela a gelificazione mediante contatto, goccia a goccia, con una soluzione contenente un sale di calcio ottenendo così pellets o granuli gelificati contenenti detti funghi filamentosi,
- essiccare detti pellets o granuli gelificati ad un contenuto di umidità di 13-18%.

15 2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta fase di gelificazione viene effettuata aggiungendo detta miscela, goccia a goccia, in detta soluzione contenente un sale di calcio.

20 3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detto mezzo di coltura per funghi filamentosi comprende almeno una fonte di carbonio scelta dal gruppo costituito da melassa, estratto di malto e saccarosio e almeno una fonte di azoto organico scelta tra estratto di lievito e "corn steep liquor".

25 4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detta almeno una fonte di carbonio costituisce da 70 a 85% in peso del peso secco del mezzo di coltura e detta almeno una fonte di azoto organico costituisce da 15 a 30% in peso del peso secco del mezzo di coltura.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 3 o 4, in cui detto mezzo di coltura comprende ulteriormente una fonte di azoto minerale.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui detta fonte di azoto

- 13 -

minerale è contenuta in una quantità non superiore al 10% in peso del peso secco del mezzo di coltura e preferibilmente compresa fra 5 e 8% in peso.

5 7. Procedimento secondo una qualunque delle precedenti rivendicazioni, in cui l'agente promotore della gelificazione è costituito da una soluzione contenente da 1 a 2 % in peso di alginato di sodio.

10 8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui detta soluzione di alginato di sodio viene aggiunta al mezzo di coltura del fungo filamentoso preferibilmente secondo un rapporto in volume mezzo di coltura/soluzione di alginato da 40:60 a 60:40.

9. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui detti eccipienti sono scelti dal gruppo comprendente terre di diatomee, preferibilmente celaton FPM 0,08, farine, preferibilmente farina di mais e zuccheri.

15 10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui detti funghi filamentosi sono di *Arthrobotrys conoides* Dreschsler e detti eccipienti comprendono almeno farina di mais.

20 11. Procedimento secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui gli eccipienti sono aggiunti alla soluzione di alginato di sodio in percentuali da 5 % a 22 % in peso sul peso della soluzione.

12. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui la soluzione contenente un sale di calcio è preferibilmente una soluzione acquosa di cloruro di calcio o di gluconato di calcio avente una concentrazione 0,2 -0,3.M.

25 13. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui i granuli o pellets essiccati hanno un diametro medio compreso tra 1 e 3 mm.

- 14 -

RIASSUNTO

- E' descritto un procedimento per la produzione di granuli o pellets contenenti funghi filamentosi comprendente le fasi di selezionare e
- 5 crescere funghi filamentosi in un adatto mezzo di coltura per un tempo prestabilito, aggiungere a detto mezzo di coltura un agente promotore di gelificazione ed almeno un eccipiente, così da ottenere una miscela, sottoporre detta miscela a gelificazione mediante contatto, goccia a goccia, con una soluzione contenente un sale di calcio ottenendo così
- 10 pellets o granuli gelificati contenenti detti funghi filamentosi, ed essiccare detti pellets o granuli gelificati ad un contenuto di umidità di 13-18%.

